

PROPRIEDADES BIOATIVAS E COMPOSTOS FENÓLICOS DE IOGURTE OVINO E IOGURTE BOVINO COM LACTULOSE

BIOACTIVE PROPERTIES AND PHENOLIC COMPOUNDS OF SHEEP YOGHURT AND BOVINE YOGHURT WITH LACTULOSE

Isadora Gazoni¹, Letícia Knakiewicz², Georgia Ane Raquel Sehn³, Darlene Cavalleiro⁴, Elisandra Rigo⁵, Alexandra Fabíola Becker⁶

¹Universidade do Estado de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Endereço. BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha - 89870-000 - Pinhalzinho - SC – Brasil. E-mail: isadora_gazoni@hotmail.com

²Universidade do Estado de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Endereço. BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha - 89870-000 - Pinhalzinho - SC – Brasil. E-mail: leticiaknakiewicz@hotmail.com

³Universidade do Estado de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Endereço. BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha - 89870-000 - Pinhalzinho - SC – Brasil. E-mail: georgia.sehn@udesc.br

⁴Universidade do Estado de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Endereço. BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha - 89870-000 - Pinhalzinho - SC – Brasil. E-mail: darlene.cavalleiro@udesc.br

⁵Universidade do Estado de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Endereço. BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha - 89870-000 - Pinhalzinho - SC – Brasil. E-mail: elisandra.rigo@udesc.br

⁶Universidade do Estado de Santa Catarina, Curso de Engenharia de Alimentos, Endereço. BR 282, KM 573, Linha Santa Terezinha - 89870-000 - Pinhalzinho - SC – Brasil. E-mail: alexandraf.becker@gmail.com

RESUMO

O uso de biocatalizadores imobilizados na síntese de substâncias prebióticas tem sido avaliada com intuito de viabilizar os processos biotecnológicos em lácteos considerando a especificidade e as condições de reações amenas. Neste sentido, o presente estudo avaliou a atividade antioxidante (ABTS e DPPH), atividade anti-inflamatória, a capacidade de inibição da enzima α -amilase e a presença de compostos fenólicos em amostras de iogurte elaboradas a partir de leite bovino e ovino integrais, com e sem síntese da lactulose *in loco*. A capacidade de inibição da enzima α -amilase foi maior nos iogurtes oriundos do leite bovino, com e sem lactulose, em relação aos do leite ovino. Já a atividade antioxidante pelo radical DPPH e a atividade anti-inflamatória não apresentaram diferença entre as matrizes lácteas, com presença ou não da lactulose, ao contrário do observado para a atividade antioxidante pelo radical ABTS e os compostos fenólicos. Estes foram maiores nos iogurtes com leite ovino. Para os iogurtes com lactulose, apenas a capacidade de inibição a enzima α -amilase para o iogurte de leite bovino foi maior em comparação ao sem lactulose, demonstrando que é necessário melhorar a síntese da lactulose com consequente aumento da concentração deste prebiótico e, assim, potencializar as propriedades bioativas do produto.

Palavras-chave: peptídeos, fermentação, bactérias ácido lácticas, prebiótico.

ABSTRACT

The use of immobilized biocatalysts in the synthesis of prebiotic substances has been evaluated in order to enable the biotechnological processes in dairy products considering the specificity and the conditions of mild reactions. In this sense, the present study evaluated the antioxidant activity (ABTS and DPPH), anti-inflammatory activity, the inhibition capacity of the α -amylase enzyme and the presence of phenolic compounds in yogurt samples made from whole bovine and sheep milks, with and without lactulose synthesis *in loco*. The inhibition capacity of the α -amylase enzyme was greater in yogurts from bovine milk, with and without lactulose, compared to those from sheep milk. The antioxidant activity by the DPPH radical and the anti-inflammatory activity, on the other hand, showed no difference between milk matrices, with or without the presence of lactulose, contrary to what was observed for the antioxidant activity for the radical ABTS and the phenolic compounds. These were higher in yogurts with sheep milk. In yogurts with lactulose, only the ability to inhibit the α -amylase enzyme for bovine milk yogurt was greater compared to lactulose-free, demonstrating that it is necessary to improve the synthesis of lactulose with a consequent increase in the concentration of this prebiotic, and thus to enhance the bioactive properties of the product.

Keywords: peptides, fermentation, lactic acid bacteria, prebiotic.

1. INTRODUÇÃO

Os leites fermentados são tradicionalmente produzidos pela fermentação espontânea, induzida pelo ácido láctico do leite (Widyastuti; Rohmatussolihat; Febrisiantosa, 2014), ou por bactérias ácido lácticas (BAL) (Serafeimidou et al., 2013), que liberam peptídeos bioativos, os quais existem naturalmente nos alimentos ou são formados ou formulados durante o processamento de alimentos (Park, 2009).

As propriedades bioativas dos alimentos têm ganho cada vez mais atenção dos consumidores pelos benefícios que trazem a saúde. Durante a fermentação microbiana, as proteínas do leite são submetidas a divisão conforme o sistema proteolítico dos micro-organismos (Hayes et al., 2007). As culturas bacterianas de *Lactobacilos spp.*, *Lactococci spp.* e *Streptococci spp.* são comumente usados para gerar hidrolisados de leite (Fitzgerald; Murray, 2006). Estudos têm demonstrado que as proteases LAB especialmente de *Lactococcus sp.* e *Lactobacillus sp.* poderiam hidrolisar ≥ 40 % das ligações peptídicas de $\alpha 1$ e β caseínas resultando na liberação de vários oligopeptídeos que são posteriormente hidrolisados por peptidases complexas (Choi et al., 2012).

Os peptídeos bioativos são fragmentos específicos de proteínas que possuem impacto nas funções do organismo e podem influenciar a saúde benéficamente (Rizzello et al., 2016), como compostos reguladores com atividade semelhante aos hormônios (Nongonierma; Fitzgerald, 2015). Para a saúde, os efeitos benéficos incluem atividades antimicrobiana, antioxidante, anti-hipertensivas e imunomoduladoras (Muniandy; Shorib; Baba, 2016; Ayyash et al., 2018).

O leite bovino é composto por 3,7 % de gordura, 3,5 % de proteína total sendo 2,8 % caseína, 4,9 % de lactose, 0,72 % de sais minerais e água (Guetouache, Guessas; Medjekal, 2014). A presença da gordura é responsável pelo sabor específico do leite bovino, pelos glóbulos de gordura ser dispersos e rodeados por uma camada fina composta de um complexo lipídico-proteico e uma pequena quantidade de carboidrato (Chatterjee et al., 2015; Douëllou; Montel; Thevenot Sergentet, 2017).

Já o leite ovino é fonte de minerais e possui quase duas vezes mais proteína em comparação ao leite bovino (Balthazar et al., 2017). A forma molecular das proteínas do leite ovino e a sequência de aminoácidos tem qualidade nutricional e impacta na digestibilidade e termoestabilidade (Claeys et al., 2014). Estas são consideradas importantes fontes de peptídeos bioativos, identificados em hidrolisados de proteína do leite e produtos lácteos fermentados (Nongonierma; Fitzgerald, 2015). Os níveis de cálcio, fósforo, magnésio, zinco, manganês e cobre são maiores em leite ovino (Wijesinha-Bettoni; Burlingame, 2013). A biodisponibilidade desses minerais faz com que este seja uma fonte importante desses elementos na dieta alimentar (Balthazar et al., 2017). Giroux, Veillette e Britten (2018) relataram valores médios de gordura ($6,42 \pm 0,04$ %), sólidos não gordurosos de ($12,4 \pm 0,01$ %), proteína ($5,79 \pm 0,12$ %) e lactose ($4,62 \pm 0,03$ %) para o leite ovino.

A indústria a fim de buscar por alimentos diferenciados e inovadores vem seguindo tendências em alimentos derivados de leite, como o crescimento pela demanda de produtos funcionais, dessa forma, lácteos como a presença de lactulose tem relevante potencial. A lactulose (4-O- β -D-galactopiranosil-D-frutose) é um prebiótico constituído por unidades de galactose e frutose, sintetizados pela primeira vez por Montgomery e Hudson (1930), como um novo açúcar, pelo seu poder dulçor equivalente a metade da sacarose (Oliveira, 2009; Ziegler; Sgarbieri, 2009), e considerado um promotor da saúde (Panesar; Kumari, 2011; Nath et al., 2016). Esta apresenta propriedades funcionais que torna sua aplicação em alimentos uma boa alternativa (Panesar; Kumari, 2011; Aït-Aïssa; Aïder, 2014), como para regulação intestinal (Panesar; Kumari, 2011; Ruszkowski; Witkowski, 2019), propriedades nutricionais e farmacológicas, baixo conteúdo calórico e baixa carcinogenicidade (Zimmer et al., 2017).

A síntese enzimática da lactulose gera menos produtos secundários, pela atuação da β -galactosidase e glicose isomerase (Zimmer et al., 2017), por ser uma reação específica. Duas das enzimas responsáveis por essa síntese são a β -galactosidase, a qual possui grande importância na indústria de lácteos, pois catalisa a conversão de lactose em glicose e galactose (Hemavathi; Raghavarao, 2011) e a glicose isomerase que converte glicose a frutose (Shakoor; Singh; Singh, 2018).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar as propriedades bioativas e os compostos fenólicos no iogurte bovino integral e iogurte ovino integral com lactulose.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Leite

O leite ovino da raça Lacaune e/ou bovino da raça Jersey foi obtido de uma fazenda localizada no interior de Lajeado Grande/SC, transportados em recipientes de 5 litros em caixa de material isotérmico contendo gelo a fim de manter a temperatura de 4 °C, até a UDESC de Pinhalzinho/SC. Os leites foram coletados em réplicas.

Os leites integrais ($>3,5\pm0,5$ %; LBI-leite bovino integral e LOI-leite ovino integral) foram submetidos a pasteurização lenta a 65 °C por 30 min sob agitação (300 rpm) em Thermomix™ (Vorwerk, modelo Bimby® 5 TM5) e, posteriormente, foram resfriados a 10 °C. O leite ovino pasteurizado e resfriado a 10 °C foi congelado (-10 °C) em recipientes de polipropileno de 140 mL em freezer vertical (Consul), sendo descongelado sob refrigeração (~10 °C) em geladeira (Brastemp) (Tribst et al., 2018) para sua utilização.

2.2. Síntese da lactulose

A síntese da lactulose nos leites (LBLU-leite bovino integral com lactulose, LBI-leite bovino integral, LOLU-leite ovino integral com lactulose e LOI-leite ovino integral) foi realizada em três etapas: (a) adição da enzima β -galactosidase imobilizada, adicionada em suporte de poliéster com espessura de 0,15 mm e diâmetro de 42 mm, com área de 160 cm², para a hidrólise da lactose em condições estabelecidas por Lima (2020), 10 ± 1 °C com 250 rpm por 34 h até hidrolisar em torno de 60 % da lactose, determinada pela análise de glicose pelo Kit de Glicose PP (Analisa®); (b) adição da enzima glicose isomerase (EC 5.3.1.5) (Sigma Sigma-Aldrich Co. - Germany) imersa em suporte de poliéster com espessura de 0,15 mm e granulometria de 42 mesh, com área de 160 cm², para realizar a isomerização da glicose durante 36 h a 8 ± 1 °C e agitação de 200 rpm (Rentschler et al., 2015); (c) transgalactosilação da frutose e galactose para síntese da lactulose.

O processo de obtenção da lactulose foi controlado pela ação da glicose isomerase, considerando a concentração de lactulose obtida. A concentração mínima de lactulose indicada em alimentos é de 3 g (Brasil, 2018), sendo esta quantificada pelo Kit de lactulose (K-Lactul; Megazyme, Bray, Co. Wicklow, Ireland) a fim de controlar o máximo de 5 g dia⁻¹ pelo efeito laxante quando consumido em maiores quantidades.

2.3. Elaboração do Iogurte

As amostras foram designadas como sendo IB – iogurte de leite bovino integral e IO – iogurte de leite ovino integral, os iogurtes controle. Já o IBLU – iogurte de leite bovino integral com lactulose e o IOLU – iogurte de leite ovino integral com lactulose foram provenientes da hidrólise da lactose seguidos da síntese da lactulose.

Após a síntese da lactulose, o leite controle (LBI e LOI) e o leite com lactulose (LBILU e LOILU) foram aquecidos à 43 °C para inoculação direta da cultura lática comercial (YF-L811, Chr. Hansen) composta por *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* na concentração de 0,003% e após distribuídos em embalagens de polietileno com capacidade para 100 mL (6,7 cm de diâmetro e 4,9 cm de altura).

O processo de fermentação foi conduzido à 43 °C em câmara BOD (Solidsteel, Brasil), até o produto atingir pH $4,8\pm0,05$, sendo imediatamente resfriado através da reprogramação da BOD para

temperatura de 4 ± 1 °C, permanecendo armazenado nesta temperatura até as análises (1° e 28° dia) (Moschopoulou et al., 2018; Feng et al., 2019).

2.4. Propriedades Bioativas e Compostos Fenólicos do Iogurte

O preparo do extrato das amostras (IBLU, IB, IOLU e IO) foi baseado no método de Wang et al. (2019) com modificações. Foram quantificadas 10 g de amostra em tubos Falcon de 50 mL e, posteriormente, centrifugadas por 10 min a 3260 G (4500 rpm) a 4 °C. Os sobrenadantes foram coletados, identificados e armazenados em ultra freezer a -80 °C para posterior análise. As amostras dos iogurtes foram analisadas no 1° e 28° dia de armazenamento.

2.4.1. Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados conforme o método descrito por Roesler et al. (2007), com modificações. O volume de 0,5 mL de amostra foi adicionado em um tubo de ensaio e misturado com 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu diluído em água destilada (1:10). A mistura foi mantida em reação durante 5 min ao abrigo de luz. Em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio 7,5 % e as soluções permaneceram em reação por 2 h ao abrigo de luz. Posteriormente, as absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 760 nm. Um branco foi preparado realizando o mesmo experimento, substituindo o extrato por água ultrapura. A concentração foi obtida com auxílio da curva-padrão de ácido gálico PA (AG) variando de 10 a 80 mg EAG L⁻¹. Os dados foram expressos como equivalentes de ácido gálico em mg por 100 g de amostra (mg EAG 100 g⁻¹).

2.4.2. Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi baseada no método de Hazra, Biswas e Mandal (2008), em que 1 mL de cada amostra foi misturado com 3 mL de nitroprussiato de sódio 10 mM em tubos de ensaio e mantido a 25 °C em banho-maria digital SSD 5L (Solidsteel, Brasil) por 2 h. Posteriormente, alíquotas de 0,5 mL foram misturadas com 1 mL de sulfonamida 0,33% e mantidos a 25 °C no mesmo banho por 5 min. Em seguida foram adicionados 1 mL de N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride (NED) 0,1% sobre a amostra e esta mistura foi mantida em banho a 25 °C por 30 min. Finalmente, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 540 nm. Para obter a concentração equivalente de trolox foi construída uma curva padrão em que foram realizadas diluições de trolox em álcool etílico em concentrações de 0,02 a 0,2 mg mL⁻¹. Um branco, utilizando álcool etílico foi analisado em paralelo seguindo o mesmo procedimento. Os resultados são com relação a inibição da α -amilase, expressos em μ mol de trolox g de amostra úmida⁻¹.

2.4.3. Capacidade de Inibição a Enzima α -amilase

A capacidade de inibição da enzima α -amilase se baseia na atividade antidiabética, pelo método de González-Muñoz et al. (2013). 500 μ L de amostra foram misturados com 500 μ L de solução tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH = 6,9) contendo a enzima α -amilase (0,5 mg mL⁻¹), em seguida a mistura foi incubada a 25 °C por 10 min em banho-maria digital SSD 5L (Solidsteel, Brasil). Posteriormente, 500 μ L de uma solução de amido 1% em tampão fosfato de sódio 0,02 M (pH = 6,9) foi adicionada à mistura de reação e esta foi incubada novamente a 25 °C durante 10 min em banho. Após, 1 mL de ácido dinitrosalicílico (DNS) 1,56% (m v⁻¹) foi adicionado e a nova mistura foi incubada em água fervente durante 10 min. Finalmente, a mistura foi resfriada à temperatura ambiente e diluída adicionando 15 mL de água destilada. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 540 nm. A acarbose foi usada como controle positivo. Para o controle utilizou-se apenas

solução tampão pH 6, no lugar do extrato. O branco de cada amostra foi analisado com a adição da solução tampão pH 6,9 e extrato sem a enzima. A porcentagem de inibição foi calculada conforme Equação 1:

$$\text{Inibição (\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{(\text{extrato-branco})}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

2.4.4. Atividade Antioxidante – Radicais ABTS e DPPH

A atividade antioxidante do radical ABTS foi determinada pelo método descrito por Helal e Tagliazucchi (2018). Em ambiente escuro foram transferidos 40 µL de amostra para tubos de ensaio e adicionado 1960 µL do radical ABTS azul-verde. A mistura incubada a 37 °C (Solidsteel modelo SSBuc 6L) por 10 min, a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro Cirrus 80 SA (Femto, Brasil) a 734 nm e os resultados obtidos através da curva padrão de trolox, expressos em mmol trolox g sólido úmido⁻¹.

Já para a atividade antioxidante através da eliminação do radical DPPH, as amostras de iogurte foram investigadas de acordo com Ardabilchi et al. (2019). Para isso, extratos de iogurte homogeneizados (250 µL) foram agitados vigorosamente em agitador de tubos Vortex Mixer K45-2810 (Kasvi, Brasil) com 3 mL de DPPH (60 µM em etanol) e colocados em ambiente escuro em temperatura ambiente. Uma amostra controle foi preparada da mesma forma, mas usando 250 µL de água em vez de extrato de iogurte. A diminuição da absorbância em 515 nm foi monitorada por espectrofotômetro até que uma leitura constante foi obtida e a porcentagem de inibição foi calculada utilizando a curva padrão de trolox e os resultados expressos em mmol mL⁻¹.

2.5. Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata. Posteriormente, os resultados foram verificados pela análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de média de Tukey com nível de significância de 5 %, através Software R. O estudo foi realizado com réplica de coletas de leite e síntese da lactulose, seguida da produção do iogurte, buscando verificar a repetibilidade dos resultados analíticos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Concentração de Lactulose Sintetizada

Na Tabela 1 estão apresentados os valores de lactulose sintetizada no leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI) após 36 h a 8 °C com enzima imobilizada (EI). O teor de lactulose sintetizado em cada matriz alimentícia apresentou diferença significativa (p<0,05) quanto a concentração inicial presente na amostra.

A fim de obter o teor de lactulose sintetizada de 3 g 100 g⁻¹ de amostra (Brasil, 2018), estabelecido como necessário em produto prebiótico, são necessárias maiores investigações para síntese enzimática *in loco*. Contudo, estudos indicam que a rota biocatalítica para a síntese de lactulose via transgalactosilação de lactose com frutose catalisada por β-galactosidase apresenta baixos rendimentos quando comparados à síntese química (Panesar, Kumari, 2011; Guerrero et al., 2017). A síntese enzimática de lactulose descrita por Vaheri e Kaupinnen (1978) apresentou produção de 8,6 g L⁻¹ de lactulose utilizando a enzima β-galactosidase na presença de lactose e frutose (em pH 7,2 e 37 °C).

Tabela 1 – Valores correspondentes ao teor de lactulose presente no leite no início da síntese e após 36 h a 8 °C com enzima imobilizada.

	LU (g L ⁻¹)	
	0 h	36 h
LBI	<0,01±0,00 ^b	0,41±0,01 ^a
LOI	<0,01±0,00 ^b	0,38±0,01 ^a

Média ± desvio padrão. Médias com letras diferentes nas linhas para o leite de cada espécie diferem significativamente ($p < 0,05$) entre os tempos de síntese. Lactulose (LU), leite bovino integral (LBI) e leite ovino integral (LOI). Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A temperatura e matriz láctea utilizada pode ter influenciado na concentração de lactulose obtida. Song et al. (2013) avaliaram a produção de lactulose e relataram que a temperatura ótima para a enzima β -galactosidade imobilizada é de 40 °C com estabilidade por um período de 150 min, na reação de transgalactosilação, e isomerização com glicose isomerase na temperatura de 60 °C por um período de 180 min, obtendo valores máximos de síntese de lactulose de 4,81 g L⁻¹ a 54 °C com tempo de reação de 2,5 h utilizando-se de lactose de soro de leite.

A fonte de enzima e as condições operacionais da reação (concentração de lactose, atividade de água, temperatura, pH, etc.) influenciam notavelmente o rendimento e a composição do produto sintetizado (galactooligossacarídeos- GOS) (Urrutia et al., 2013).

Em geral, o rendimento de GOS aumenta com o aumento da concentração de lactose (Vera et al., 2012). Em condições ideais, os rendimentos de GOS estão entre 30 e 40% (Gosling et al., 2010). O uso de β -galactosídeses geralmente reconhecidas como seguras (GRAS) para esgotar a lactose do leite é extensivo na indústria de laticínios como uma resposta à intolerância à lactose. Ainda, o pH do leite (~6,7) é apropriado para a atividade de muitas β -galactosídeses.

A formação de GOS durante o tratamento do leite com β -galactosídeses foi raramente relatada (Ruiz-Matute et al., 2012), provavelmente devido ao fato de que o teor de lactose no leite bovino, em torno de 5 %, ser significativamente menor em comparação a soluções tamponadas de lactose (15-50 %) empregadas para promover a reação de transgalactosilação (Ganzle; Haase; Jelen, 2008). O uso de permeado de soro de leite para sintetizar GOS é mais comum (Lorenzen et al., 2013).

3.2. Propriedades bioativas e Compostos Fenólicos do Iogurte

A capacidade de inibição da enzima α -amilase (Figura 1 A) foi superior para os iogurtes de leite bovino integral e com lactulose (IB e IBLU), ($p > 0,05$) no 1º dia, sendo que o armazenamento refrigerado não modificou a capacidade de inibição da enzima α -amilase no período de 28 dias ($p > 0,05$). O mesmo comportamento não foi observado para os iogurtes de leite ovino integral e com lactulose (IO e IOLU) ($p < 0,05$) no 1º dia de armazenamento, pois o IOLU apresentou maior atividade do que o IO. No entanto, para o período de 28 dias de armazenamento ocorreu aumento da inibição ($p < 0,05$) para IOLU e IO, sem diferença significativa. Apesar de inicialmente os iogurtes apresentarem diferentes atividades, a origem do leite e o processo de fermentação contribuíram para as atividades dos iogurtes de leite ovino. Cabe ressaltar que em 28 dias a % de inibição da enzima α -amilase foi superior a 80 % para todos os iogurtes.

Ayyash et al. (2018) obtiveram inibições da α -amilase maior que 34% para o leite fermentado bovino. A inibição da atividade de α -amilase pode ser considerada como uma abordagem eficaz para controlar o diabetes por meio da diminuição da hidrólise de carboidratos (Donkor et al., 2012). A inibição geral de α -amilase pode ser atribuída a peptídeos bioativos, principalmente os menores (Gomes da Cruz, et al., 2009).

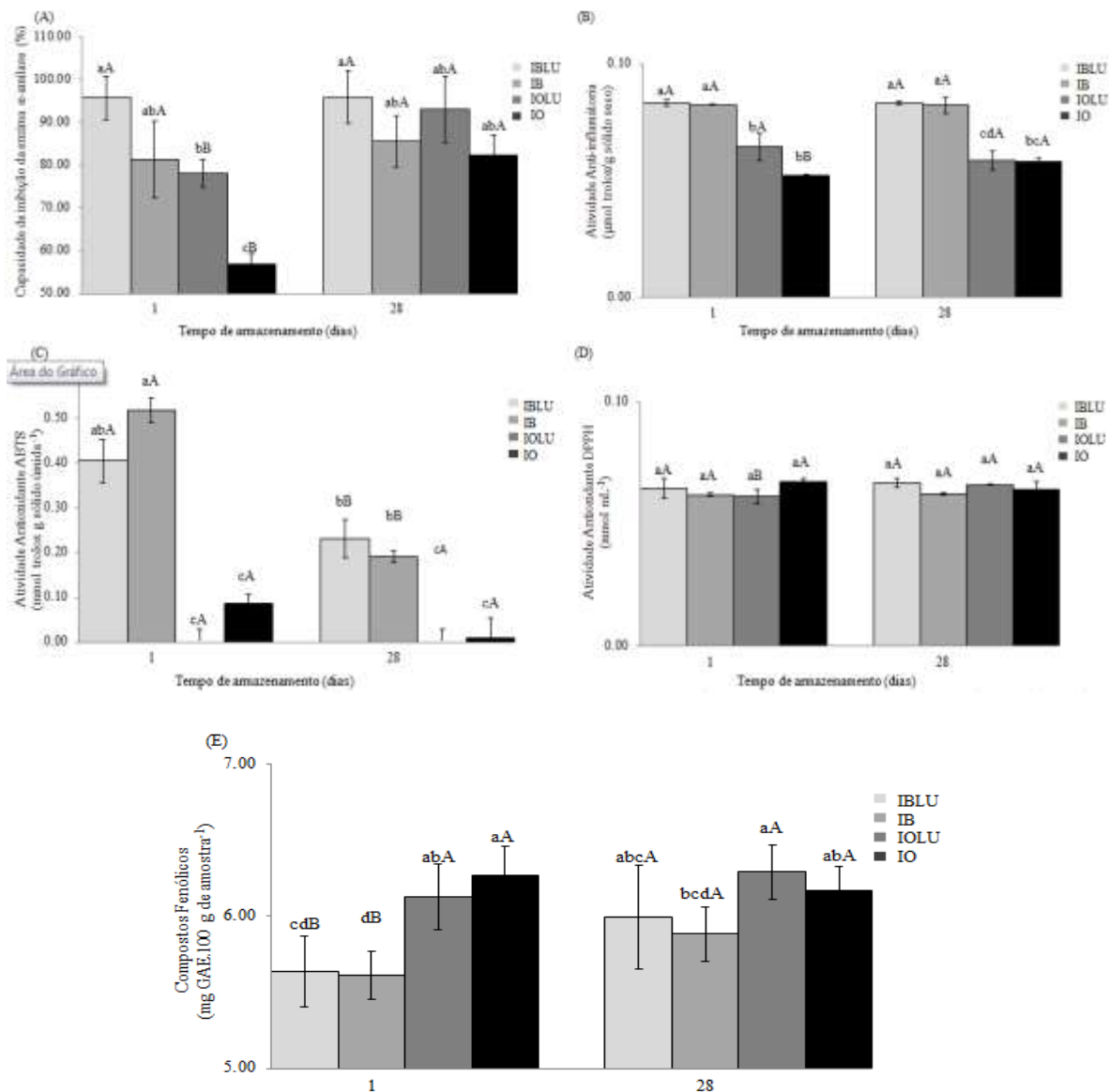


Figura 1 – Propriedades bioativas dos iogurtes A) capacidade de inibição da enzima α -amilase, B) atividade anti-inflamatória, C) atividade antioxidante por ABTS, D) atividade antioxidante por DPPH e E) compostos fenólicos totais para iogurte de leite bovino integral com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino integral (IB), iogurte de leite ovino integral com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino integral (IO), no 1° e 28° dia de armazenamento a 4 °C.

Média $\pm$ desvio padrão. Valores seguidos por mesma letra minúscula em cada dia de armazenamento não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Valores seguidos por mesma letra maiúscula em cada amostra nos diferentes dias de armazenamento não apresentam diferenças significativas no nível de confiança de 95 % ($p < 0,05$). Iogurte de leite bovino com lactulose (IBLU), iogurte de leite bovino (IB), iogurte de leite ovino com lactulose (IOLU) e iogurte de leite ovino (IO). Fonte: Elaborado pela autora, 2020.

A atividade anti-inflamatória (Figura 1 B) obteve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras dos iogurtes produzidos com distintos leites, sendo que o IBLU e IB obtiveram valores maiores e não foi possível observar diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tempos de armazenamento (1° e 28° dia). Para o IOLU não teve diferença significativa ($p > 0,05$) até o 28° dia de armazenamento, já o IO teve aumento ($p < 0,05$) entre o 1° e 28° dia de armazenamento. A atividade anti-inflamatória tem ação no organismo devido à sua composição terpenica, os terpenos são conhecidos como inibidores do complexo proteico - NF- κ B que está envolvido na resposta celular a estímulos como o estresse, citocinas, radicais livres, que são um importante fator de transcrição de citocinas pró-inflamatórias

(Borges et al., 2019). Ou seja, a ação anti-inflamatória só acontece quando possui terpenos que inibem o complexo NF- κ B, que é o responsável por pequenas inflamações.

A atividade antioxidante pelo radical ABTS teve comportamento diferente de acordo com a matriz láctea (Figura 1 C). O IBLU e IB se mantiveram em maior concentração ao longo dos 28 dias de armazenamento. Diferente do comportamento observado para o IOLU e IO, pode-se perceber uma tendência quando se compara a matriz láctea utilizada na elaboração dos iogurtes, ou seja, o leite bovino possui maior atividade antioxidante ABTS se comparado ao leite ovino. Já a diminuição de atividade ao longo do armazenamento pode estar relacionada com a captura de um elétron da molécula a fim de formar um par e aumentar o potencial para atividade antioxidante, gerando instabilidade, não sendo possível a formação do radical livre, ou seja, atividade antioxidante reduzida ao longo do armazenamento.

Já a atividade antioxidante pelo radical DPPH não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) entre todas as amostras (Figura 1 D). Apenas o IOLU apresentou diferença significativa ($p<0,05$) quanto ao armazenamento, um pequeno aumento no 28º dia.

Os compostos fenólicos totais apresentaram valores superiores no IOLU e IO no 1º dia de armazenamento (Figura 1 E). O IB e IBLU não apresentaram diferença significativa ($p>0,05$) no 1º dia de armazenamento, mas com diferença ($p<0,05$) em relação ao IO e IOLU. Já no 28º dia de armazenamento as amostras não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$). Para o IBLU e IB tiveram aumento e diferença significativa ($p<0,05$) do 1º ao 28º dia de armazenamento, o mesmo não ocorreu ao IOLU e IO. Ou seja, o processo fermentativo possivelmente auxiliou na hidrólise de proteínas que formam os peptídeos bioativos, aumentando assim o teor de compostos fenólicos totais do IBLU e IB. No geral, o processo de síntese de lactulose não contribuiu para o aumento da bioatividade dos iogurtes.

O baixo pH aumenta a estabilidade de compostos fenólicos durante o armazenamento (Chouchouli et al., 2013), enquanto a presença de proteínas ou grandes peptídeos e gordura deve manter a integridade dos compostos fenólicos durante a digestão aumentando sua bioacessibilidade (Lamothe et al., 2014), comportamento inverso ocorreu durante o armazenamento.

4. CONCLUSÃO

A busca por inovação nos processos industriais é uma realidade vivenciada constantemente, com isso novos processos são pesquisados a fim de melhorar a qualidade dos produtos, agregar valor comercial e diminuir custos industriais, como meios de realizar síntese de prebióticos *in loco*. A composição do leite ovino em relação ao leite bovino resultou na obtenção de atividades bioativas diferenciadas nos iogurtes. Em virtude dos níveis de lactulose terem sido inferiores a $0,5 \text{ g L}^{-1}$, seus teores não influenciaram nas características dos iogurtes produzidos. Estudos de suplementação do meio e das variáveis de processo a fim de aumentar a concentração de lactulose sintetizada por via enzimática ainda são necessários.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Santa Catarina (FAPESC 2019TR648 e 2019TR744), a Cabanha Três Leites, a Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, a Prozyn e a ICL Food Specialties.

5. REFERÊNCIAS

AÏT-AISSA, A.; AÏDER, M. Lactose electroisomerization into lactulose: Effect of the electrode material, active membrane surface area-to-electrode surface area ratio, and interelectrode-membrane distance. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 4811–4823, 2014.

ARDABILCHI, M.; AMJADI, S.; ARDABILCHI, M.; ROUFEGARINEJAD, L.; JAFARI, S.M. Fortification of yogurt with flaxseed powder and evaluation of its fatty acid profile, physicochemical, antioxidant, and sensory properties. **Powder Technology**, v. 359, 2019.

AYYASH, M.; AL-NUAIMI, A. K.; AL-MAHADIN, S.; LIU, S.-Q. In vitro investigation of anticancer and ACE-inhibiting activity, α -amylase and α -glucosidase inhibition, and antioxidant activity of camel milk fermented with camel milk probiotic: A comparative study with fermented bovine milk. **Food Chemistry**, v. 239, p. 588–597, 2018.

BALTHAZAR, C. F.; PIMENTEL, T. C.; FERRÃO, L. L.; ALMADA, C. N.; SANTILLO, A.; ALBENZIO, M.; MOLLAKHALILI, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; NASCIMENTO, J. S.; SILVA, M. C.; FREITAS, M. Q.; SANT'ANA, A. S.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G. Sheep Milk: Physicochemical Characteristics and Relevance for Functional Food Development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 2, p. 247-262, 2017.

BORGES, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; PEREIRA, A. C. M.; KEITA, H.; CARVALHO, J. C. T. Rosmarinus officinalis essential oil: a review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity and mechanisms of action involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 229, p. 29-45, 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Probióticos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=2864062&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=probioticos&inheritRedirect=true>. Acesso em: 14 out. 2018.

CHATTERJEE, A.; CHANDRA DAS, P.; PAUL, A.; DEY, R.; PAUL, A.; ADAK, K.; GHOSH, S. The effect of addition of β -carotene on casein, lactose & acidity of whole milk. **Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology**, v. 9, n. 5, p. 142-147, 2015.

CHOI, J.; SABIKHI, L.; HASSAN, A.; ANAND, S. Bioactive peptides in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, n. 1, p. 1–12. 2012.

CHOUCHOU, V.; KALOGEROPOULOS, N. KONTELES, S.; KARVELLA, E.; MARKIS, D. P.; KARATHANOS, V. T. Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinífera*) seed extracts. **LWT**, v. 53, p. 522-529, 2013.

CLAEYS, W. L.; VERRAES, C.; CARDOEN, S.; DE BLOCK, J.; HUYGHEBAERT, A.; RAES, K.; DEWETTINCK, K.; HERMAN, L. Consumption of raw or heated milk from different species: an evaluation of the nutritional and potential health benefits. **Food Control**, v. 42, p. 188–201, 2014.

DONKOR, O. N.; STOJANOVSKA, L.; GINN, P.; ASHTON, J.; VASILJEVIC, T. Germinated grains - sources of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 950–959, 2012.

DOUËLLOU, T.; MONTEL, M. C.; THEVENOT SERGENTET, D. Invited review: Anti adhesive properties of bovine oligosaccharides and bovine milk fat globule membrane associated glycoconjugates against bacterial food enteropathogens. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 5, p. 3348-3359, 2017.

FENG, C.; WANG, B.; ZHAO, A.; WEI, L.; SHAO, Y.; WANG, Y.; CAO, B.; ZHANG, F. Quality characteristics and antioxidant activities of goat milk yogurt with added jujube pulp. **Food Chemistry**, v. 277, p. 238–245, 2019.

FITZGERALD, R. J.; MURRAY, B. A. Bioactive peptides and lactic fermentations. **International Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 118–125, 2006.

GANZLE, M. G., HAASE, G., JELEN, P. Lactose: crystallization, hydrolysis and value-added derivatives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 685–694, 2008.

GIROUX, H. J.; VEILLETTE, N.; BRITTEN, M. Use of denatured whey protein in the production of artisanal cheeses from cow, goat and sheep milk. **Small Ruminant Research**, v. 161, p. 34-42, 2018.

GOMES DA CRUZ, A.; BURITI, F. C. A.; BATISTA DE SOUZA, C. H.; FONSECA FARIA, J. A.; ISAY SAAD, S. M. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 8, p. 344–354, 2009.

GONZÁLEZ-MUÑOZ, A.; QUESILLE-VILLALOBOS, A. M.; FUENTEALBA, C.; SHETTY, K.; GÁLVEZ RANILLA, L. Potential of Chilean native corn (*Zea mays* L.). Accessions as natural sources of phenolic antioxidants and in vitro bioactivity for hyperglycemia and hypertension management. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10995-11007, 2013.

GOSLING, A.; STEVENS, G. W.; BARBER, A. R.; KENTISH, S. E.; GRAS, S. L. Recent advances refining galactooligosaccharide production from lactose. **Food Chemistry**, v. 121, p. 307–318, 2010.

GUERRERO, C.; VERA, C.; ILLANES, A. Immobilization of *Aspergillus oryzae* β -galactosidase in an agarose matrix functionalized by four different methods and application to the synthesis of lactulose. **Bioresource Technology**, v. 232, p. 53-63, 2017.

GUETOUCHE, M.; GUESSAS, B.; MEDJEKAL, S. Composition and nutritional value of raw milk. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research-IBSPR**, v. 2, n. 10, p. 115–122, 2014.

HAFEEZ, Z.; DARY-MOUROT, A.; MICLO, L.; CAKIR-KIEFER, C.; ROUX, E.; PERRIN, C. Strategies of producing bioactive peptides from milk proteins to functionalize fermented milk products. **Food Research International**, n. 63, p. 71–80, 2014.

HAYES, M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Putting microbes to work: Dairy fermentation, cell factories and bioactive peptides. Part II: Bioactive peptide functions. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 435–449, 2007.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 63, 2008.

HELAL, A.; TAGLIAZUCCHI, D. Impact of in vitro gastro-pancreatic digestion on polyphenols and cinnamaldehyde bioaccessibility and antioxidant activity in cinnamon-fortified yogurt. **LWT**, v. 89, p. 164-170, 2018.

HEMAVATHI, A. B.; RAGHAVARAO, K. S. M. S. Membrane processing for purification and concentration of β -glycosidases of Barley (*Hordeum vulgare*). **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 282–290, 2011.

LAMOTHE, S.; AZIMY, L.; BAZINET, N.; COUILLARD, C.; BRITTEN, M. Interaction of green tea polyphenols with dairy matrices in a simulated gastrointestinal environment. **Food & Function**, v. 5, p. 2621–2631, 2014.

LIMA, P. C. **Imobilização da enzima β -Galactosidase em suporte de quitosana ativada com genipina para aplicação em lácteos**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Pinhalzinho, 2020.

LORENZEN, P. C.; BREITER, J.; CLAWIN-RÄDECKER, I.; DAU, A. A novel bienzymatic system for lactose conversion. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 1396-1403, 2013.

MOSCHOPOULOU, E.; SAKKAS, L.; ZOIDOU, E.; THEODOROU, G.; SGOURIDOU, E.; KALATHAKI, C.; LIARAKOU, A.; CHATZIGEORGIOU, A.; POLITIS, I.; MOATSOU, G. Effect of milk kind and storage on the biochemical, textural and biofunctional characteristics of set-type yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 77, p. 47-55, 2018.

MUKHOPADHYA, A.; SWEENEY, T. **Proteínas do leite: processamento de frações bioativas e efeitos na saúde intestinal**. Proteínas do leite - da estrutura às propriedades biológicas e aspectos de saúde. 2016.

MUNIANDY, P.; SHORIB, A. B.; BABA, A. S. Influence of green, white and black tea addition on the antioxidant activity of probiotic yogurt during refrigerated storage. **Food Packaging and Shelf Life**, v. 8, p. 1-8, 2016.

NATH, A.; VERASZTÓ, B.; BASAK, S.; KORIS, A.; KOVÁCS, Z.; VATAI, G. Synthesis of Lactose-Derived Nutraceuticals from Dairy Waste Whey – a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 1, p. 16-48, 2016.

NONGONIERMA, A. B.; FITZGERALD, R. J. Milk proteins as a source of tryptophan containing bioactive peptides. **Food and Function**, v. 6, p. 2115–2127, 2015.

OLIVEIRA, M. N. **Tecnologia de produtos lácteos funcionais**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S. Lactulose: production, purification and potential applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 940-948, 2011.

PARK, Y. W. **Bioactive Components in Milk and Dairy Products**. Wiley-Blackwell: John Wiley & Sons, v. 1, 2009, p. 440.

RENTSCHLER, E.; SCHUH, K.; KREWINKEL, M.; BAUR, C.; CLAABEN, W.; MEYER, S.; KUSCHEL, B.; STRESSLER, T.; FISCHER, L. Enzymatic production of lactulose and epilactose in milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 10, p. 1–9, 2015.

RIZZELLO, C. G.; TAGLIAZUCCHI, D.; BABINI, E.; RUTELLA, G. S.; TANEYO SAA, D. L.; GIANOTTI, A. Bioactive peptides from vegetable food matrices: Research trends and novel biotechnologies for synthesis and recovery. **Journal of Functional Foods**, v. 27, p. 549–569, 2016.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Antioxidant activity of cerrado fruits. **Food Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 53–60, 2007.

RUIZ-MATUTE, A. I.; CORZO-MARTÍNEZ, M.; MONTILLA, A.; OLANO, A.; COPOVI, P.; CORZO, N. Presence of mono-, di- and galactooligosaccharides in commercial lactose-free UHT dairy products. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 28, p. 164–169, 2012.

RUSZKOWSKI, J.; WITKOWSKI, J. Lactulose: Patient-and dose-dependent prebiotic properties in humans. **Anaerobe**, v. 59, p. 100–106, 2019.

SERAFEIMIDOU, A.; ZLATANOS, S.; KRITIKOS, G.; TOURIANIS, A. Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 1, p.24–30, 2013.

SHAKOOR, S.; SINGH, G.; SINGH, M. Glucose Isomerase Production and Its Application In Various Field. **International Journal of Scientific Research in Science and Technology**, v. 4, n. 5, p. 690-699, 2018.

SONG, Y. S.; LEE, H.-U.; PARK, C.; KIM, S.-W. Optimization of lactulose synthesis from whey lactose by immobilized β -galactosidase and glucose isomerase. **Carbohydrate Research**, v. 369, p. 1-5, 2013.

TORRES, D. P.; GONCALVES, M.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Galactooligosaccharides: Production, properties, applications, and significance as prebiotics. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 438–454, 2010.

TRIBST, A. A. L.; RIBEIRO, L. R.; LEITE JUNIOR, B. R. D. C.; DE OLIVEIRA, M. M.; CRISTIANINI, M. Fermentation profile and characteristics of yoghurt manufactured from frozen sheep milk. **International Dairy Journal**, v. 78, p. 36-45, 2018.

URRUTIA, P.; RODRIGUEZ-COLINAS, B.; FERNANDEZ-ARROJO, L.; ALLESTEROS, A. O.; WILSON, L.; ILLANES, A.; PLOU, F. J. Detailed analysis of galactooligosaccharides synthesis with β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1081–1087, 2013.

VAHERI, M.; KAUPPINEN, V. The formation of lactulose (4-O- β -galactopyranosylfructose) by β -galactosidase. **Acta Pharm Fennicae**, v. 87, p. 75-83, 1978.

VERA, C.; GUERRERO, C.; CONEJEROS, R.; ILLANES, A. Synthesis of galactooligosaccharides by β -galactosidase from *Aspergillus oryzae* using partially dissolved and supersaturated solution of lactose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 50, p. 88–194, 2012.

WANG, L.; CLARDY, A.; HUI, D.; GAO, A.; WU, Y. Antioxidant and antidiabetic properties of Chinese and Indian bitter melos (*Momordica charantia* L.). **Food Bioscience**, v. 29, p. 73-80, 2019.

WIDYASTUTI, Y.; ROHMATUSSOLIHAT; FEBRISANTOSA, A. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 435–442, 2014.

WIJESINHA-BETTONI, R.; BURLINGAME, B. A. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. In: Chapter 3: Milk and dairy product composition. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome, p. 41–90, 2013.

ZIEGLER, F. L. F.; SGARBIERI, V. C. Chemical-nutritional characterization of a whey protein isolate a bovine collagen hydrolysate and mixtures of the two products. **British Journal of Nutrition**, v. 22, n. 1, p. 61-70, 2009.

ZIMMER, F. C.; GOHARA, A. K.; SOUZA, A. H. P.; MATSUSHITA, M.; SOUZA, N. E.; RODRIGUES, A. C. Obtainment, quantification and use of lactulose as a functional food – a review. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 515-521, 2017.